

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



REC'D 17 DEC 2003

WIPO

PCT

Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen:

102 46 967.9

Anmeldetag:

09. Oktober 2002

Anmelder/Inhaber:

Dr.rer.nat. Hermann Heinrich und
Dr.rer.nat. Klaus-Jürgen Kurth, Rostock/D

Bezeichnung:

Verfahren und Vorrichtung zur nichtinvasiven Unter-
suchung von Stoffwechselprozessen

IPC:

A 61 B, G 01 N

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 28. November 2003
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag


Letang

BEST AVAILABLE COPY

**Erfinder/ Anmelder:**

Dr.rer.nat. Hermann Heinrich, D-1057 Rostock

Am Vögenteich 16/802

Dr.rer.nat. Klaus-Jürgen Kurth, D-18055 Rostock

St.-Georg-Straße 31

Deutsche Patentanmeldung**„Verfahren und Vorrichtung zur nichtinvasiven Untersuchung von Stoffwechselprozessen“**

Die Erfindung betrifft ein Verfahren und eine Anordnung zur nichtinvasiven Untersuchung von Steuer- und Regulationsprozessen im menschlichen und tierischen Stoffwechsel, um aus den Veränderungen einzelner Stoffwechselparameter Rückschlüsse auf spezifische Erkrankungen ziehen zu können.

Dieses Verfahren findet Anwendung bei präventiven Untersuchungen zur Krebsfrüherkennung, entzündlichen Erkrankungen und der Bestimmung des Antioxidantienbedarfs, der Therapiekontrolle der einzelnen Krankheitsbilder sowie der Routineuntersuchung bei Berufsgruppen mit besonderer physischer und psychischer Belastung.

Fluoreszenzspektrometrische Untersuchungen sind seit einigen Jahren als hochgenaue und sehr spezifische Verfahren in der biologischen Grundlagenforschung zu Transportprozessen durch biologische Membranen und biomedizinische Untersuchungen als diagnostisches Hilfsmittel bekannt und befinden sich z. Zt. in einer stetigen progressiven Entwicklungsphase. Die Grundlage der Meßverfahren ist die Kenntnis der Eigenschaften künstlicher Fluorophore bzw. die Kenntnis der Excitations- und Emissionswellenlänge von Autofluorophoren. Eine Vielzahl von stoffwechselrelevanten Parametern wie Tryptophan, Adenosin triphosphat (ATP), Guanosin triphosphat (GTP), Nicotinamid adenin dinucleotid phosphat (NADP), Nicotinamid adenin dinucleotid reduziert (NADH), Kynurenin, Flavin adenin dinucleotid (FAD) und Thromboxan besitzen eine sogenannte Autofluoreszenz.

Die Bestimmung dieser Autofluoreszenzen besitzt den Vorteil, daß dem Stoffwechsel keine unphysiologischen Substanzen zugeführt werden müssen. So wird im Patent, DE 35 42 167 A1, die Änderung der Autofluoreszenz von Ascorbinsäure während des Oxidationsprozesses zur Bestimmung der Augenlinsentrübung in einem nichtinvasiven Verfahren genutzt.

Weiterführende Arbeiten nutzen die hohe native Fluoreszenz von NADH zum Nachweis von Melanomen, DE 695 18 915 T2.

Im Patent, DE 32 10 593 A1, wird in einem invasivem Verfahren mittels Endoskop die Autofluoreszenz des NADH zur Bestimmung des Oxido-Reduktionszustandes von Organen benutzt.

Im Patent, DE 19 53 51 14 A1, wird die unterschiedliche Autofluoreszenz biologischen Gewebes im Emissionsbereich von 520 – 600 nm zur Diagnose von krebsbefallenem Gewebe verwendet, wobei auf keine spezielle biologisch relevante Substanz Bezug genommen wird. Auch bei diesem Verfahren muß die Meßvorrichtung mittels eines Endoskops invasiv an den Meßort gebracht werden.

Nach umfangreichen Experimenten wurde in den Patenten, US 59 83 125, US 57 69 081, US 53 69 496, US 60 91 985, US 60 80 584, US 63 46 101 B 1, US 2002 / 000 23 37 A 1, US 59 43 113, US 62 05 353 B1, das fluoreszenzspektrometrische Verhalten biologischer Gewebe und Organe hinsichtlich einer präventiven Krebsdiagnostik beschrieben. Zur Auswertung wurden die Intensitäten einzelner Substanzen wie Tryptophan, NADH und Flavine wie auch die maximale Fluoreszenzintensität im Wellenlängenbereich von 320 – 580 nm herangezogen. Zusätzlich wurden auch Ergebnisse der Fourieranalyse zur Auswertung herangezogen.

Bei den Untersuchungen konnte nachteilig festgestellt werden, daß weder die Verwendung der maximalen Fluoreszenzintensität im Wellenlängenbereich von 320 nm – 600 nm oder die absoluten Fluoreszenzintensitäten relevanter Stoffwechselparameter wie NADH, Tryptophan, FAD und Kynurenin noch das Verhältnis von zwei Substanzen wie NADH und Kynurenin eine eindeutige Trennung zwischen „Gesund“ und Krebsbelastung gestattet.

So ist z. B. ein geringes Verhältnis zwischen den Intensitäten von NADH und Kynurenin nicht nur charakteristisch für eine Krebsbelastung, sondern alle entzündlichen Erkrankungen weisen ein ähnliches Verhältnis auf. Dies ist nicht absonderlich, da viele Krebserkrankungen mit entzündlichen Erscheinungen einhergehen.

Ein weiterer Nachteil der oben beschriebenen invasiven Methoden ist es, daß durch die Stressbelastung des Messvorganges eine verfälschte Momentaufnahme des Stoffwechsels entsteht und keine Aussagen über Stoffwechselregelungsprozesse möglich sind. Eine solche Aussage kann nur durch eine in kurzen Abständen wiederholbare streßfreie Meßung oder durch zeitlich definierte Messungen vor und nach einer Streßbelastung erfolgen.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zu Grunde, ein Verfahren und eine Vorrichtung vorzuschlagen, die es ermöglichen, Steuer- und Regelungsprozesse des menschlichen und tierischen Stoffwechsels zu beschreiben, um bei Veränderungen dieser Prozesse Rückschlüsse auf spezifische Krankheitsbilder ziehen zu können. Das Verfahren soll den eigentlichen Messvorgang nichtinvasiv und schnell wiederholbar machen, um keine Streßbelastung durch den Meßprozeß hervorzurufen.

Erfindungsgemäß wird diese Aufgabe durch die in den Patentansprüchen offenbarten Merkmale gelöst,

Die Vorteile der Erfindung liegen in der nichtinvasiven Messung der Fluoreszenzspektren und der dadurch garantierten Stressfreiheit. Infolge dieses Messvorganges können in sehr kurzen zeitlichen Abständen Wiederholungsmessungen erfolgen und somit Regulationsvorgänge im Stoffwechsel erkannt werden. Durch Veränderungen dieser Regulationsprozesse unter definierten Stressbedingungen können Rückschlüsse auf krankhafte Veränderungen des Organismus gezogen werden.

Die Erfindung wird nachfolgend an einem Ausführungsbeispiel näher erläutert. Die beigefügten Zeichnungen zeigen:

Fig. 1 Blockschaltbild der Messwerterfassung

Fig. 2 Native Fluoreszenzspektren

Fig. 3 Ergebnisdarstellung eines einfachen biochemischen Modells als Selektionstufe

Fig. 4 Ergebnis der Separation von Krebserkrankungen und entzündlichen Erkrankungen

Fig. 5 Selektion unter Verwendung der Emissionswellenlängen 509 nm und 495 nm

Mittels einer optischen Messstrecke nach Fig. 1, die aus einem Lichtleitkabel 1 zur Zuführung des Anregungsstrahls und einem Lichtleitkabel 2 mit Kolimator 3 zur Ableitung des Meßsignals besteht, wird an einer geeigneten Stelle des Körpers, vorzugsweise der Falte zwischen Daumen und Zeigefinger angebracht. Beide Lichtleitkabel 1; 2 sind in einem ergonomisch geformten Träger, vorzugsweise einem Handstück 4 untergebracht und stehen mit ihren Austrittsöffnungen vorzugsweise senkrecht zueinander.

Eine Lichtquelle 5, die aus einem Laser oder einer gesteuerten Xe-Blitzlampe mit nachgeschaltetem Monochromator oder Filter besteht, erzeugt das Licht zur Anregung der Autofluoreszenz und wird über den Lichtleitkabel 1 an den Meßort geleitet. Die Wellenlängen des Anregungslichtes liegen vorzugsweise bei 287 nm, 305 nm, 326 nm und 337 nm.

Das durch die Anregung am Meßort emittierte Fluoreszenzlicht wird durch den Kolimator 3 gesammelt und in den Lichtleitkabel 2 eingekoppelt und einem Spektrometer 6 zugeführt. Das Spektrometer kann sowohl mit einem CCD Zeilensensor als auch einem Photomultiplier mit vorgeschaltetem akustooptischen Monochromator als Wandlereinheit bestückt sein.

Die optischen Spektren, die im Spektrometer 6 in elektrische Signale umgewandelt wurden, werden nun in einer entsprechenden Rechnerstruktur 7 abgespeichert.

Die im Rechner gespeicherten Fluoreszenzspektren, die aus den erfassten Wellenlängen im Bereich von 287 nm bis 600 nm und den dazugehörigen Fluoreszenzintensitäten bestehen, werden in einem geeigneten Tabellenformat zur Auswertung vorbereitet.

Fig. 2 zeigt Beispiele dieser nativen Spektren.

Aus diesen Tabellen werden die Wertepaarungen (Wellenlänge und Fluoreszenzintensität) für stoffwechselrelevante, biologisch aktive Substanzen wie ATP, GTP, Tryptophan, Orotsäure, NADP, NADH, FAD usw. ausgewählt. Die Anregungswellenlängen und Emissionswellenlängen dieser Substanzen wurden in umfangreichen Vorversuchen bestimmt. Da unterschiedliche Hautstrukturen und Hautbestandteile die Verwendung der Absolutwerte nicht zulassen, kann nur mit Relativwerten eine weitere Auswertung erfolgen. Es ist also notwendig, Wertepaarungen der relevanten, biologisch aktiven Substanzen zu bestimmen, und in biophysikalischen und biochemischen Modellen zu verknüpfen. Diese Modelle beinhalten Substanzen, die während der Stoffwechselvorgänge miteinander reagieren, ineinander umwandeln und/oder sich gegenseitig in ihrer Konzentration und Reaktionsfähigkeit beeinflussen.

Fig. 3 zeigt die Darstellung des Ergebnisses eines einfachen biochemischen Modells, das als erste Selektionsstufe der Diagnostik Verwendung findet, und aus der Verknüpfung von NADH, Kynurenin, FAD, NADP und Thromboxan besteht. Diese Darstellung lässt erkennen, dass selbst die Verwendung von fünf stoffwechselrelevanten Substanzen nicht ausreichend ist, um Krebserkrankungen von entzündlichen Erkrankungen zu trennen. Die erste Selektionsstufe ist nur geeignet „Krank“ und „Gesund“ zu unterscheiden.

Im Anschluss werden weitere Selektionsstufen durchlaufen, um entzündliche Erkrankungen von Krebserkrankungen zu differenzieren bzw. auch unter den entzündlichen Erkrankungen eine Differenzierung zu erkennen.

Fig. 4 zeigt eine Separation zwischen Krebserkrankungen bzw. behandelter Krebserkrankungen und entzündlichen Erkrankungen.

Parallel zur Auswertung der Spektren durch Selektion der Erkrankungen mittels biophysikalischer und biochemischer Modelle auf der Basis bekannter biologisch aktiver Substanzen, erfolgt eine Auswertung durch selbstlernende Systeme, die nach Unterschieden in den Spektren von gesunden Probanden und Patienten suchen, ohne eine bekannte Wertepaarung (Wellenlänge und Intensität) biologisch aktiver Substanzen zu verwenden.

Fig. 5 zeigt eine zusätzliche Selektion bei den Wellenlängen 509 nm und 495 nm, wobei die emittierenden Substanzen bisher nicht bekannt sind, die Verwendung dieser Selektion jedoch Erfolg zeigt.

Bezugszeichenliste

1. Lichtleitkabel zur Zuführung des Anregungslichtes
2. Lichtleitkabel zur Ableitung des Fluoreszenzlichtes
3. Kolimator
4. Handstück
5. Lichtquelle
6. Spektrometer
7. Rechnerstruktur

Erfinder/Anmelder:

Dr.rer.nat, Hermann Heinrich, D-1057 Rostock

Am Vögenteich 16/802

Dr.rer.nat. Klaus-Jürgen Kurth, D-18055 Rostock

St.-Georg-Straße 31

Patentansprüche

1. Verfahren für die nichtinvasive und / oder invasive Untersuchung von Steuer- und Regulationsprozessen des menschlichen und tierischen Stoffwechsels, zur Diagnose von Krankheiten und präventiven Untersuchungen, zu Routineuntersuchungen von Berufsgruppen und Sportlern mit hoher physischer und psychischer Stressbelastung, zur Therapiekontrolle, zum Verlauf von Dialyse- und Apheresebehandlung sowie zur Bestimmung des Antioxidantienbedarfs, **gekennzeichnet dadurch**, dass stoffwechselrelevante Substanzen, die während der Stoffwechselvorgänge miteinander reagieren, ineinander umwandeln und / oder sich gegenseitig in ihrer Konzentration und Reaktionsfähigkeit beeinflussen und die eine (endogene) Autofluoreszenz aufweisen, in ihrer Fluoreszenzintensität und somit mittelbar in ihrer Konzentration bestimmt werden, nach biochemischen Erfordernissen in mathematische Beziehung zueinander gesetzt und mit indikationsbezogenen Modellen, die den Stoffwechselzustand von Krankheiten definieren verglichen werden.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass die indikationsbezogenen Modelle aus mehreren (mindestens jedoch 6) berechneten Größen bestehen, die den jeweiligen Stoffwechselzustand der Krankheitsbilder entsprechen und durch mathematische Verknüpfungen wie Quotienten, Produkte, Summen, Differenzen oder komplexere Formeln aus den Fluoreszenzintensitäten berechnet werden.
3. Verfahren nach Anspruch 1 und 2, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Fluoreszenzintensitäten im Wellenlängenbereich von 287 nm bis 800nm, vorzugsweise von 340nm bis 600nm, für stoffwechselrelevante Substanzen deren Emissionswellenlängen bekannt sind vorzugsweise ATP, GTP, FAD, NADH, NADP, Kynurenin, Orotsäure, Thromboxan und Tryptophan gemessen werden.
4. Verfahren nach Anspruch 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Messung der Fluoreszenzintensitäten zu einem definierten Zeitpunkt und/oder in definierten zeitlichen Abständen erfolgt, so dass durch diese Verlaufsmessungen Steuer- und Regulationsprozesse aufgedeckt werden.
5. Verfahren nach Anspruch 1 bis 4, **dadurch gekennzeichnet**, dass zu einem definierten Zeitpunkt der Messung eine psychische oder physische Stressbelastung des Patienten erfolgt, die Fluoreszenzintensitäten vor und nach der Belastung mehrmals gemessen werden und das Regulationsgeschehen im Stoffwechsel bestimmt wird.
6. Verfahren nach Anspruch 1 bis 5, **dadurch gekennzeichnet**, dass biologisch aktive Substanzen, die eine Autofluoreszenz zeigen im zellulären und interzellulären Bereich mit Licht einer Excitationswellenlänge von 287 nm bis 340 nm, vorzugsweise 340 nm zur Emission angeregt werden.

7. Vorrichtung nach Anspruch 1 bis 6, **dadurch gekennzeichnet**, dass die zur Fluoreszenzemission angeregten Bereiche am Ohrläppchen, der Hand und dem Nasenflügel, vorzugsweise der Hautfalte zwischen dem Daumen und dem Zeigefinger liegen.

8. Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens nach oben genannten Ansprüchen, **dadurch gekennzeichnet**, dass das zur Anregung benötigte monochromatische Licht durch eine Lichtquelle (5) vorzugsweise einen Laser oder einer Xe – Blitzlampe mit optischem Filter erzeugt wird und über ein Lichtleitkabel (1) an den Messort geleitet wird.

9. Vorrichtung nach Anspruch 8, **dadurch gekennzeichnet**, dass das emittierte Licht der Autofluorophore vom Messort über ein Lichtleitkabel (2) zu einem Spektrometer (6) mit einem CCD – Zeilensensor oder einem akustooptischen Monochromator und Photomultiplier geleitet wird und nach einer Digitalisierung der Messwerte die Emissionsintensitäten durch geeignete Rechnerstrukturen (7) ausgewertet werden.

10. Vorrichtung nach Anspruch 8 bis 9, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Auswertung in den Rechnerstrukturen mittels mathematischer Modelle biologischer Regulationssysteme und/oder selbstlernender Systeme erfolgt.

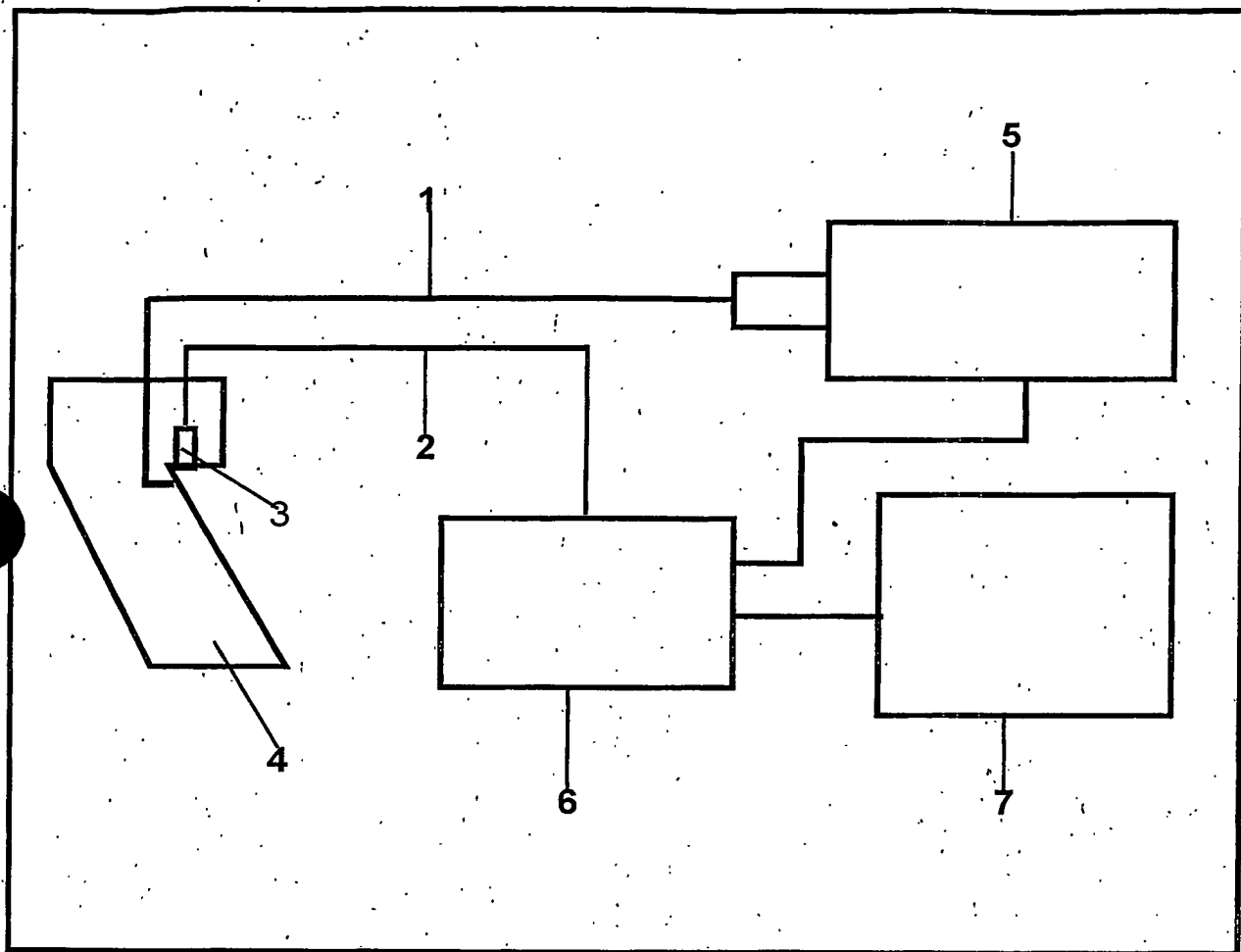


Fig. 1

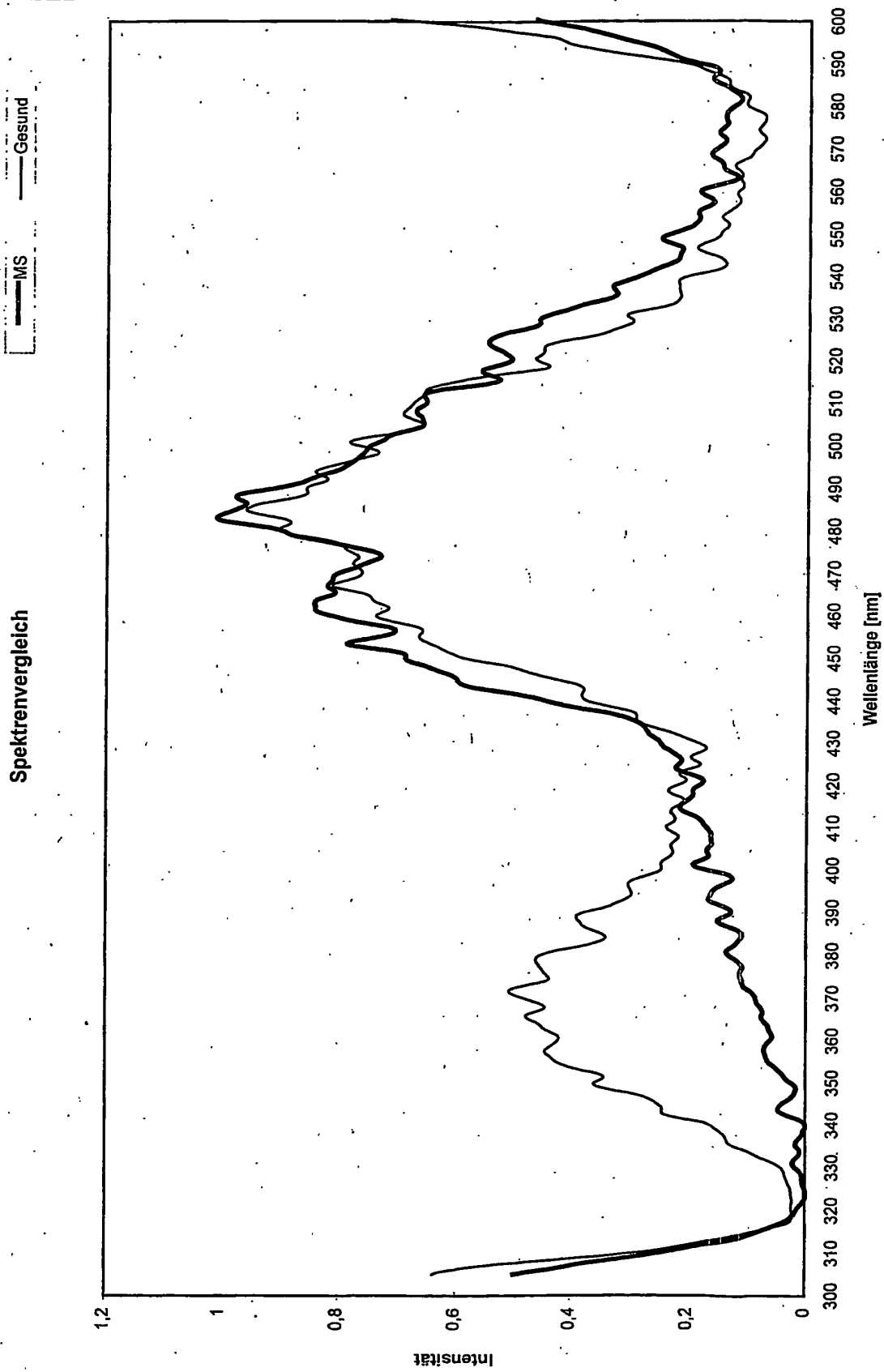


Fig. 2

16

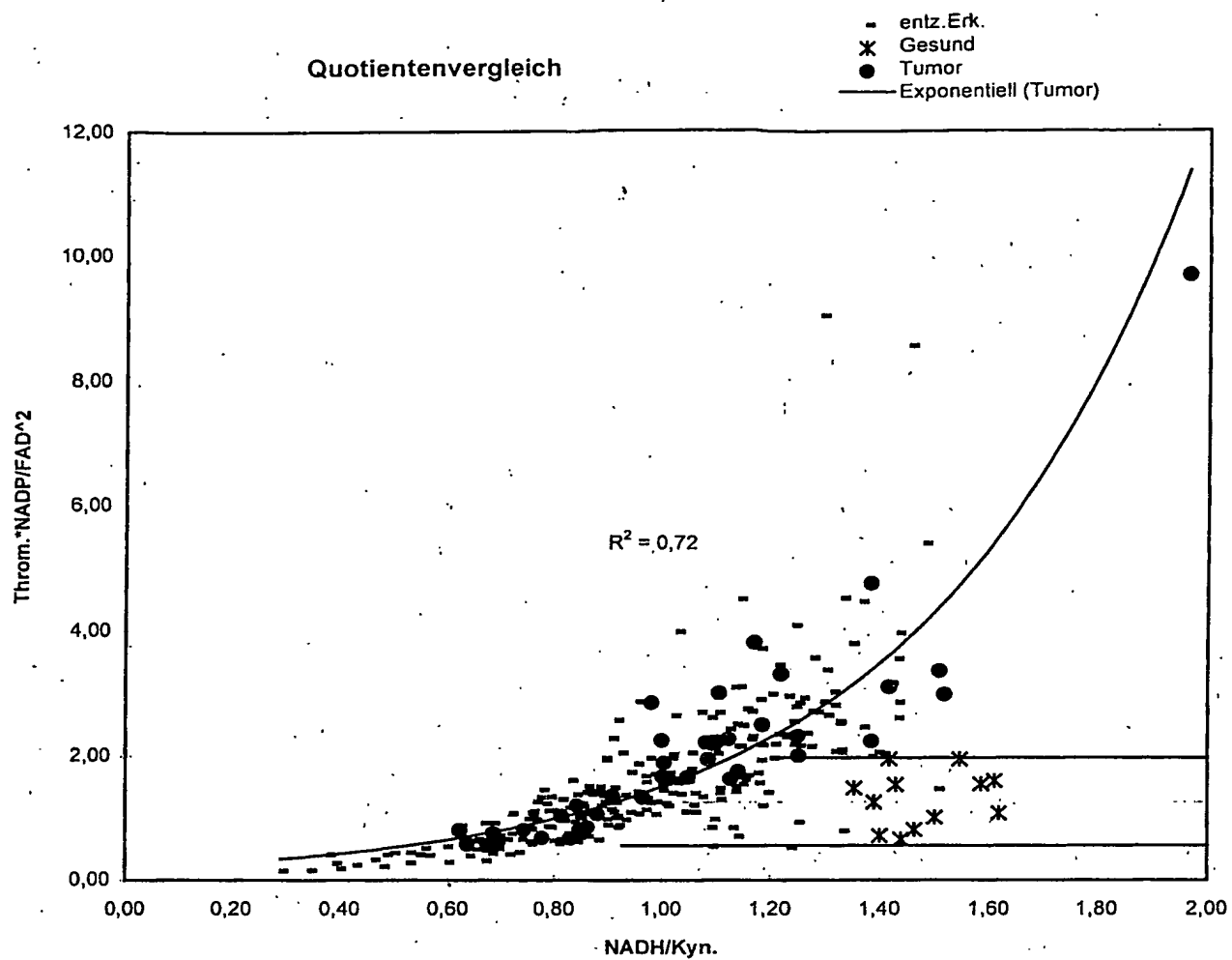


Fig. 3

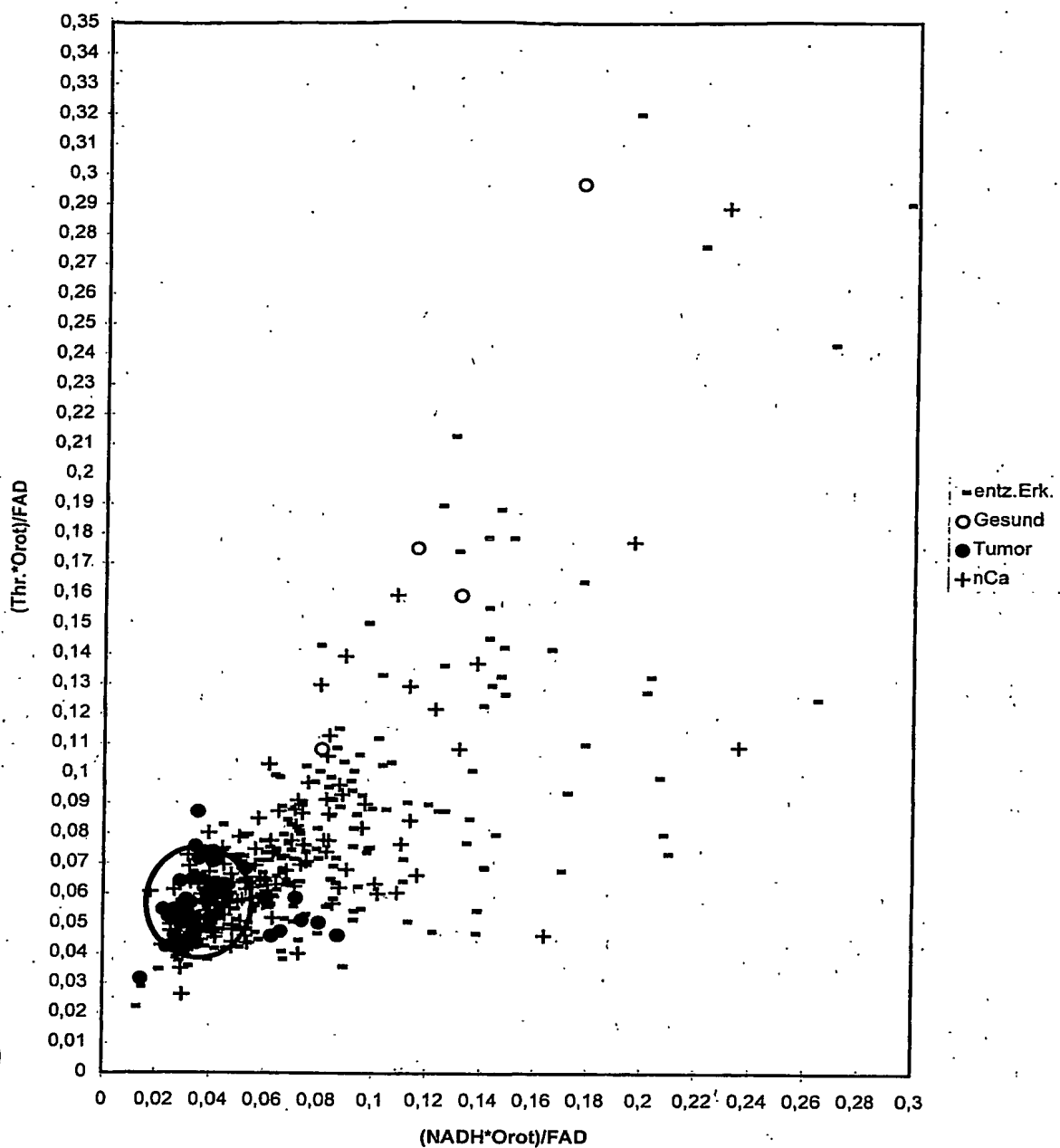


Fig. 4'

115

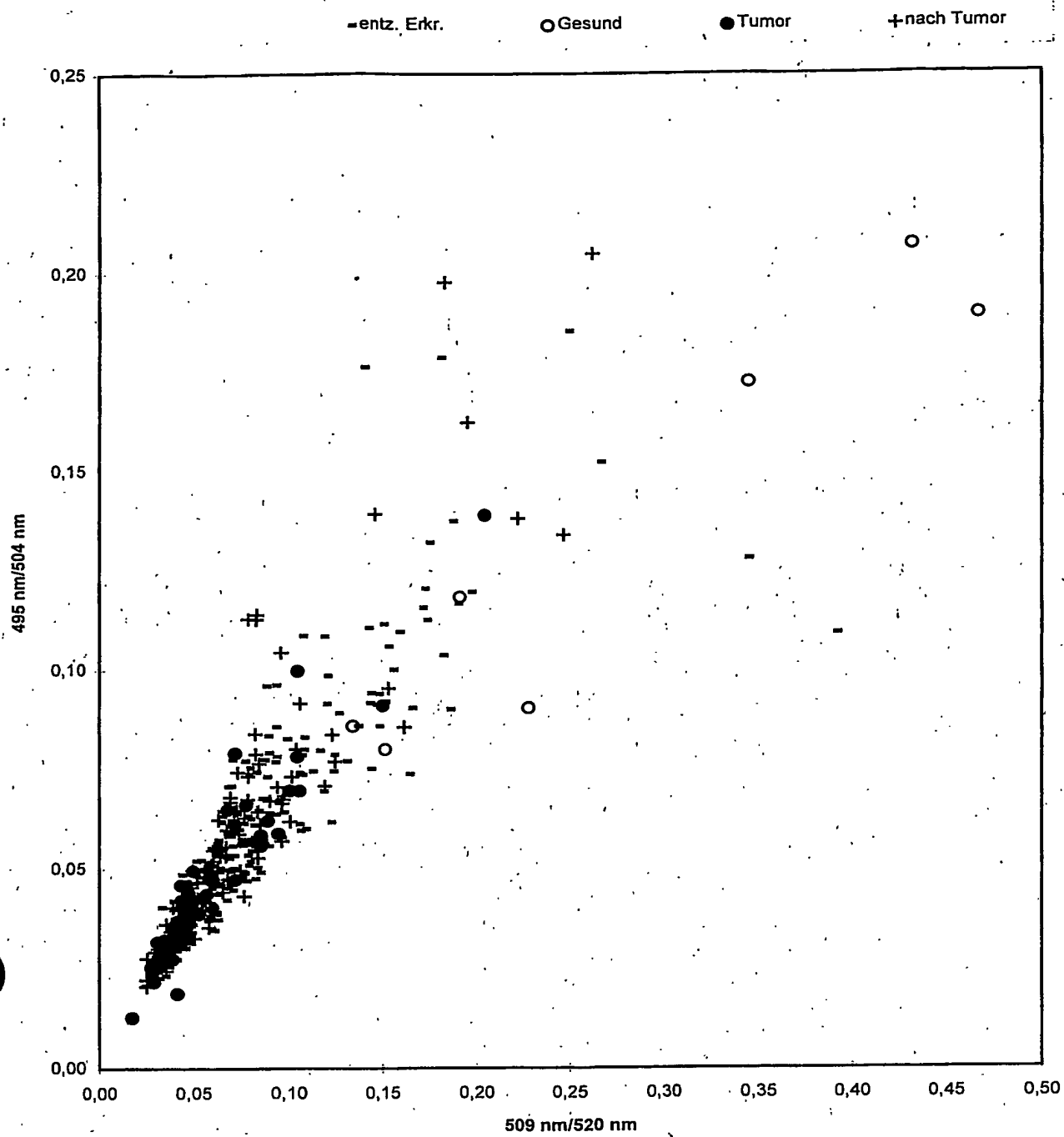


Fig. 5

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINE(S) OR MARK(S) ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.